

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-139532
(43)Date of publication of application : 22.05.2001

(51)Int.Cl.

C07C233/01
C01B 31/02
C01B 33/02
C03C 23/00
C07C231/02

(21)Application number : 11-320945

(71)Applicant : TOYO KOHAN CO LTD

TAKAHASHI KOJIRO
NIPPON PAAKAARAIJINGU HIROSHIMA KOJO:KK

(22)Date of filing : 11.11.1999

(72)Inventor : NIKA MICHIFUMI
OKAMURA HIROSHI
TAKAGI KENICHI
TAKAHASHI KOJIRO
TAKAI OSAMU
TAKAGI MAKOTO
TAKENAKA SHIGEORI

(54) CHEMICALLY MODIFIED BORDER BRIM AND METHOD OF MANUFACTURING FOR THE SAME

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a chemically modified border brim capable of effectively carrying out an analysis and a preservation of a DNA, useful in molecular biology, biochemistry or the like.

SOLUTION: This chemically modified border brim is obtained by fixing an end of a hydrocarbon group having another end bonded to an active ester group, to a surface of a solid support through amide combination.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]	27.10.2000
[Date of sending the examiner's decision of rejection]	20.01.2004
[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]	
[Date of final disposal for application]	
[Patent number]	3786248
[Date of registration]	31.03.2006
[Number of appeal against examiner's decision of rejection]	2004-03118
[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]	17.02.2004
[Date of extinction of right]	

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2001-139532

(P2001-139532A)

(43)公開日 平成13年5月22日 (2001.5.22)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコ-ト ⁸ (参考)
C 0 7 C 233/01		C 0 7 C 233/01	4 G 0 4 6
C 0 1 B 31/02	1 0 1	C 0 1 B 31/02	1 0 1 Z 4 G 0 5 9
33/02		33/02	Z 4 G 0 7 2
C 0 3 C 23/00		C 0 3 C 23/00	Z 4 H 0 0 6
C 0 7 C 231/02		C 0 7 C 231/02	

審査請求 有 請求項の数15 O L (全 5 頁)

(21)出願番号 特願平11-320945

(22)出願日 平成11年11月11日 (1999.11.11)

(71)出願人 390003193
東洋鋼板株式会社
東京都千代田区四番町2番地12

(71)出願人 598025382
高橋 浩二郎
広島県広島市南区宇品御幸1丁目9番26号

(71)出願人 591091135
株式会社日本パーカーライジング広島工場
広島県広島市南区出島1丁目34番26号

(74)代理人 100100103
弁理士 太田 明男

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 化学修飾を施した基体およびその製造方法

(57)【要約】

【課題】DNAの解明やDNA保存を効率的に行うこと
ができる、分子生物学分野、生化学分野等において有用な
化学修飾を施した基体を提供する。

【解決手段】一方の末端に活性化エステル基が結合した
炭化水素基の他方の末端を、固体支持体表面にアミド結
合を介して基体に固定化させて化学修飾を施す。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 一方の末端に活性化エステル基が結合した炭化水素基の他方の末端を、固体支持体表面にアミド結合を介して固定化させたことを特徴とする化学修飾を施した基体。

【請求項2】 活性化エステル基がN-ヒドロキシスクシンイミドエステル基である請求項1記載の化学修飾を施した基体。

【請求項3】 活性化エステル基がp-ニトロフェノールエステル基である請求項1記載の化学修飾を施した基体。

【請求項4】 固体支持体がダイヤモンド、グラファイト、ダイヤモンドライカーボン、シリコン、又はガラスである請求項1、2、又は3記載の化学修飾を施した基体。

【請求項5】 固体支持体表面にアミド結合を介して末端にカルボキシル基を有する炭化水素基を結合し、該カルボキシル基を活性化エステル化することを特徴とする化学修飾を施した基体の製造方法。

【請求項6】 固体支持体表面にアミド結合を介して末端にカルボキシル基を有する炭化水素基を結合し、該カルボキシル基をN-ヒドロキシスクシンイミド活性化エステル化することを特徴とする化学修飾を施した基体の製造方法。

【請求項7】 固体支持体表面にアミド結合を介して末端にカルボキシル基を有する炭化水素基を結合し、該カルボキシル基をp-ニトロフェノール活性化エステル化することを特徴とする化学修飾を施した基体の製造方法。

【請求項8】 固体支持体表面にアミド結合を介して末端にカルボキシル基を有する炭化水素基を結合して得られる表面修飾された固体支持体を、カルボジイミドあるいはジシクロヘキシルカルボジイミド、およびN-ヒドロキシスクシンイミドと反応させて、該支持体のカルボキシル基を脱水縮合することを特徴とする化学修飾を施した基体の製造方法。

【請求項9】 固体支持体表面にアミド結合を介して末端にカルボキシル基を有する炭化水素基を結合して得られる表面修飾された固体支持体を、カルボジイミドあるいはジシクロヘキシルカルボジイミド、およびp-ニトロフェノールと反応させて、該支持体のカルボキシル基を脱水縮合することを特徴とする化学修飾を施した基体の製造方法。

【請求項10】 固体支持体表面にアミド結合を介して末端にカルボキシル基を有する炭化水素基を結合させるに当たり、固体支持体表面を塩素化し、ついでアミノ化して得られる第1級アミノ基と酸クロリドとを反応させてカルボニル化することを特徴とする請求項6、7、8、又は9記載の化学修飾を施した基体の製造方法。

【請求項11】 固体支持体表面に第1級アミノ基を形

成させ、該第1級アミノ基に、N-ヒドロキシスクシンイミド活性化エステル化したジカルボン酸を反応させることを特徴とする化学修飾を施した基体の製造方法。

【請求項12】 固体支持体表面に第1級アミノ基を形成させ、該第1級アミノ基に、p-ニトロフェノール活性化エステル化したジカルボン酸を反応させることを特徴とする化学修飾を施した基体の製造方法。

【請求項13】 N-ヒドロキシスクシンイミド活性化エステル化したジカルボン酸が、ジカルボン酸にカルボジイミドあるいはジシクロヘキシルカルボジイミド、およびN-ヒドロキシスクシンイミドを反応させて得られるものである請求項11記載の化学修飾を施した基体の製造方法。

【請求項14】 p-ニトロフェノール活性化エステル化したジカルボン酸が、ジカルボン酸にカルボジイミドあるいはジシクロヘキシルカルボジイミド、およびp-ニトロフェノールを反応させて得られるものである請求項12記載の化学修飾を施した基体の製造方法。

【請求項15】 固体支持体表面に第1級アミノ基を形成させるに当たり、固体支持体表面を塩素化し、ついでアミノ化することを特徴とする請求項11、12、13、又は14記載の化学修飾を施した基体の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、分子生物学分野、生化学関連分野において有用な、核酸又は蛋白を固定化可能な化学修飾を施した基体に関するものである。例えば、DNAを固体支持体表面に固定化して保存し、必要なときに取り出してポリメラーゼ連鎖反応 (Polymerase chain reaction; PCR)によりDNAのセグメントを増幅して、DNAを解析するという全く新しい発想の基で成し遂げられたものである。

【0002】

【従来の技術】 遺伝子解析は分子生物学、生化学の分野で有用であり、近年では病気の発見等医療分野でも利用されている。

【0003】 遺伝子解析において、近年DNAチップが開発され解析速度が著しく速くなった。しかし従来のDNAチップはスライドガラス或いはシリコン基板表面にポリリジン等の高分子を塗布し、その後にDNAを固定する方法である。また、フォトリソグラフ等の半導体技術を用いてガラス基板上にオリゴヌクレオチドを合成する方法が用いられている。

【0004】 しかし、スライドガラス或いはシリコン基板表面にポリリジン等の高分子を塗布してDNAを固定する方法では、DNAの固定化状態が不安定であり、ハイブリッド形成工程や洗浄工程において、DNAが剥離するといった問題が生じる。また、半導体技術を用いたDNAチップは、製造工程の煩雑さから非常に高価であるという問題がある。このような問題点を解決するため

には、固体支持体表面にDNAを高密度で且つ強固に固定化する必要がある。

【0005】また、従来、固体支持体の表面を化学修飾した基体が知られている。しかし、カルボン酸等にDNAを結合させるには、カルボン酸の活性化が必要となるため、基板の化学修飾だけでは不十分である。

【0006】本発明は、DNAの解明やDNA保存を効率的に行うことができ、分子生物学分野、生化学分野等において有用な化学修飾を施した基体を提供しようすることを目的とするものである。また、本発明は、DNA或いは蛋白を安定に固定化するための基体を提供することを目的とするものである。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記目的を達成すべく鋭意検討の結果、固体支持体表面を化学修飾してN-ヒドロキシスクシンイミドエステル或いはp-ニトロフェノールエステル等の活性化エステル基を含む炭化水素基を有する基体が、DNA等を安定して固定可能なことを見いだし、本発明に到達した。請求項1の基体は、一方の末端に活性化エステル基が結合した炭化水素基の他方の末端を、固体支持体表面にアミド結合を介して固定化させたことを特徴とする。請求項2の基体は、活性化エステル基がN-ヒドロキシスクシンイミドエステル基であることを特徴とする。請求項3の基体は、活性化エステル基がp-ニトロフェノールエステル基であることを特徴とする。請求項4の基体は、固体支持体がダイヤモンド、グラファイト、ダイヤモンドライカーボン、シリコン、又はガラスであることを特徴とする。請求項5の化学修飾を施した基体の製造方法は、固体支持体表面にアミド結合を介して末端にカルボキシル基を有する炭化水素基を結合し、該カルボキシル基を活性化エステル化することを特徴とする。請求項6の化学修飾を施した基体の製造方法は、固体支持体表面にアミド結合を介して末端にカルボキシル基を有する炭化水素基を結合し、該カルボキシル基をN-ヒドロキシスクシンイミド活性化エステル化することを特徴とする。請求項7の化学修飾を施した基体の製造方法は、固体支持体表面にアミド結合を介して末端にカルボキシル基を有する炭化水素基を結合し、該カルボキシル基をp-ニトロフェノール活性化エステル化することを特徴とする。請求項8の化学修飾を施した基体の製造方法は、固体支持体表面にアミド結合を介して末端にカルボキシル基を有する炭化水素基を結合して得られる表面修飾された固体支持体を、カルボジイミドあるいはジシクロヘキシカルボジイミド、およびN-ヒドロキシスクシンイミドと反応させて、該支持体のカルボキシル基を脱水縮合することを特徴とする。請求項9の化学修飾を施した基体の製造方法は、固体支持体表面にアミド結合を介して末端にカルボキシル基を有する炭化水素基を結合して得られる表面修飾された固体支持体を、カルボジイミドあるいはジシクロヘキシカルボジイミド、およびN-ヒドロキシスクシンイミドと反応させて、該支持体のカルボキシル基を脱水縮合することを特徴とする。請求項10の化学修飾を施した基体の製造方法は、固体支持体表面にアミド結合を介して炭化水素基の末端に活性エステル基が結合した基を固定化することである。例えば活性エステル基がN-ヒドロキシスクシンイミドエステル基の場合に

いはジシクロヘキシカルボジイミド、およびp-ニトロフェノールと反応させて、該支持体のカルボキシル基を脱水縮合することを特徴とする。請求項10の化学修飾を施した基体の製造方法は、固体支持体表面にアミド結合を介して末端にカルボキシル基を有する炭化水素基を結合させるに当たり、固体支持体表面を塩素化し、ついでアミノ化して得られる第1級アミノ基と酸クロリドとを反応させてカルボニル化することを特徴とする。請求項11の化学修飾を施した基体の製造方法は、固体支持体表面に第1級アミノ基を形成させ、該第1級アミノ基に、N-ヒドロキシスクシンイミド活性化エステル化したジカルボン酸を反応させることを特徴とする。請求項12の化学修飾を施した基体の製造方法は、固体支持体表面に第1級アミノ基を形成させ、該第1級アミノ基に、p-ニトロフェノール活性化エステル化したジカルボン酸を反応させることを特徴とする。請求項13の化学修飾を施した基体の製造方法は、N-ヒドロキシスクシンイミド活性化エステル化したジカルボン酸が、ジカルボン酸にカルボジイミドあるいはジシクロヘキシカルボジイミド、およびN-ヒドロキシスクシンイミドを反応させて得られるものであることを特徴とする。請求項14の化学修飾を施した基体の製造方法は、p-ニトロフェノール活性化エステル化したジカルボン酸が、ジカルボン酸にカルボジイミドあるいはジシクロヘキシカルボジイミド、およびp-ニトロフェノールを反応させて得られるものであることを特徴とする。請求項15の化学修飾を施した基体の製造方法は、固体支持体表面に第1級アミノ基を形成させるに当たり、固体支持体表面を塩素化し、次いでアミノ化することを特徴とする。

【0008】

【発明の実施の形態】本発明の基体は、固体支持体の表面に特定の化学修飾を施したことを特徴とするものである。本発明における化学修飾とは、炭化水素基の末端に活性エステル基が結合した基を、固体支持体表面にアミド結合を介して固定化することをいう。このような化学修飾によって、DNA等或いは蛋白を基体の表面に固定しやすくなる。

【0009】炭化水素基は、炭素数0～12、中でも0～6のものが好ましい。例えば、蟻酸、酢酸、プロピオノ酸などのモノカルボン酸；シュウ酸、マロン酸、コハク酸、マレイン酸、フマル酸などのジカルボン酸；トリメリット酸等の多価カルボン酸等があげられる。中でもシュウ酸、コハク酸が好ましい。

【0010】炭化水素基の末端に結合する活性エステル基としては、N-ヒドロキシスクシンイミドエステルあるいはp-ニトロフェノールエステルが好ましい。

【0011】このような化学修飾は、固体支持体にアミド結合を介して炭化水素基の末端に活性エステル基が結合した基を固定化することである。例えば活性エステル基がN-ヒドロキシスクシンイミドエステル基の場合に

は、塩素ガス中で固体支持体に紫外線照射して表面を塩素化し、次いでアンモニアガス中で紫外線照射してアミノ化した後、適当な酸クロリドを用いてカルボキシル化し、末端のカルボキシル基をカルボジイミド或いはジシクロヘキシルカルボジイミドおよびN-ヒドロキシスクシンイミドと脱水縮合することにより行うことができる。この方法を採用する場合の脱水縮合について一例を挙げて説明すると、表面を化学修飾し、カルボキシル基を有する状態の固体支持体をカルボジイミドあるいはジシクロヘキシルカルボジイミド、およびN-ヒドロキシスクシンイミド或いはp-ニトロフェノールを溶解した1, 4-ジオキサン溶液中に浸漬させ、洗净後乾燥する。このようにして、N-スクシンイミドエステル基やp-ニトロフェノールエステル基を末端に有する炭化水素基が結合した基体が得られる。

【0012】また、上記の方法より好ましい方法として、特に、あらかじめダイヤモンド等の固定支持体（基板）上に形成された第1級アミノ基に、活性化ジエステルの一方のエステル基を脱水縮合させることにより形成されることが望ましい。

【0013】活性化ジエステルとは、上記した活性エステル基を2つ有しているものをいう。エステル基は活性化ジエステル中の両端に位置していることが好ましく、炭素数0～12、好ましくは0～6のものが好ましい。エステル基を除いた骨格部分は直鎖状飽和脂肪酸が好ましい。

【0014】活性化ジエステルを用いた方法として、同様に塩素化し、次いでアミノ化後、このアミノ基に対し、予めシュウ酸（ジカルボン酸）をN-ヒドロキシスクシンイミド活性化エステル化して得られる活性化エステルを反応させ、所望の基体を得る方法が挙げられる。

【0015】この方法におけるN-ヒドロキシスクシンイミド活性化エステル化とは、ジカルボン酸をカルボジイミド2.5mg/mlおよびN-ヒドロキシスクシンイミド1.5mg/mlを溶解した1, 4-ジオキサン溶液(3mm角ダイヤモンド1枚に対し100μlとなる量)に溶解して15分間反応させ、活性化ジエステルを得るものである。この活性化エステルをアミノ基をしておいて固体支持体に結合させ、化学修飾を完了する。この方法は、本発明者らがはじめて開発したものである。固体支持体表面を活性化エステル基で化学修飾した状態の商品とすることにより、ユーザーはそれを用いて容易にDNAを直に固体支持体表面にアミド結合により固定化することができる。

【0016】シュウ酸ジクロリドは入手困難であるが、シュウ酸をN-ヒドロキシスクシンイミド活性化エステルにすることで容易に固体支持体表面を化学修飾できる。

【0017】本発明において上記のような化学修飾を行う固体支持体としては、ダイヤモンド、金、銀、銅、ア

ルミニウム、タンクスチル、モリブデン等の金属；上記金属とセラミックスとの積層体；ポリカーボネート、フッ素樹脂等のプラスチック等が挙げられる。その他の材料でも、化学的に安定な材料であれば使用でき、例えば、グラファイト、ダイヤモンドライカーボンが挙げられる。また、プラスチックと上記金属、セラミックス、ダイヤモンド等との混合体でもよい。

【0018】これらのうち、熱伝導性の点からダイヤモンドが好ましい。ダイヤモンドは熱伝導性に優れおり、急速な冷却が可能であるため、PCR等の加熱冷却を繰り返すヒートサイクル時間を効果的に短縮できる。本発明の基体の熱伝導率は、0.1W/cm·K以上、好ましくは0.5W/cm·K以上、特好ましくは1.0W/cm·K以上であることが好ましい。1.0W/cm·K以上とすることにより、DNAを本発明の基体の化学修飾部分に固定化させてPCR等を行う場合、加熱・冷却の追随性に優れているからである。

【0019】ダイヤモンド基板の素材として、合成ダイヤモンド、高压形成ダイヤモンド、或いは天然のダイヤモンド等のいずれも使用できる。また、それらの構造が単結晶体或いは多結晶体のいずれでも差し支えない。生産性の観点よりマイクロ波プラズマCVD法などの気相合成法を用いて製造されたダイヤモンドを用いることが好ましい。

【0020】本発明の基体の形成方法は公知の方法で行うことができる。例えば、マイクロ波プラズマCVD法、ECR CVD法、IPC法、直流スパッタリング法、ECRスパッタリング法、イオンプレーティング法、アークイオンプレーティング法、EB蒸着法、抵抗加熱蒸着法などが挙げられる。また、金属粉末やセラミック粉末等に樹脂をバインダーとして混合して結合形成したものが挙げられる。また、金属粉末やセラミック粉末等の原料をプレス成形機を用いて圧粉したものを高温で焼結したものもあげられる。

【0021】本発明の基体の基板表面は意図的に粗面化されていることが望ましい。このような粗面化表面は基体の表面積が増えて多量のDNA等を固定させることに好都合であるからである。基体の形状は平板状、糸状、球状、多角形状、粉末状など特に問わない。さらに、このダイヤモンド基板は、ダイヤモンドと他の物質との複合体（例えば、2層からなる基板）であってもよい。

【0022】

【実施例】以下実施例により本発明を説明する。

実施例1

塩素ガス中で3mm角のCVDダイヤモンドに紫外線照射して表面を塩素化し、次いでアンモニアガス中で紫外線照射してアミノ化した後、酸クロリドを用いてクロロホルム中で還流してカルボキシル化した。この表面が修飾された固体支持体を、カルボジイミド2.5mg/mlおよびN-ヒドロキシスクシンイミド1.5mg/ml

1を溶解した1, 4-ジオキサン溶液(3mm角ダイヤモンド1枚に対し100μlとなる量)中に15分間浸漬させ、末端カルボキシル基を脱水結合した。反応終了後水洗し、さらに、1, 4-ジオキサン溶液で洗净後乾燥し、化学修飾された基体を得た。

【0023】実施例2

塩素ガス中で3mm角のシリコン基板に紫外線照射して表面を塩素化し、次いでアンモニアガス中で紫外線照射してアミノ化後、このアミノ基に対し、予めシュウ酸(ジカルボン酸)をN-ヒドロキシスクシンイミド活性化エステル化して得られる活性化ジエステルを反応させた。N-ヒドロキシスクシンイミド活性化エステル化は、以下のようにして行った。シュウ酸をカルボジイミド2.5mg/mlおよびN-ヒドロキシスクシンイミド1.5mg/mlを溶解した1, 4-ジオキサン溶液(3mm角ダイヤモンド1枚に対し100μlとなる量)に溶解して15分間反応させ、活性化ジエステルを得た。この活性化ジエステルを予めアミノ基を付しておいた固体支持体に結合させ、化学修飾を施した基体を得た。

【0024】上記に示す実施例1と実施例2で作成した

基体を用いて、20merのオリゴヌクレオチドを固定した後、相補的な配列を持つ蛍光標識プローブとハイブリッド形成し、蛍光光度計を用いてオリゴヌクレオチド固定化量を見積もった。その結果、実施例1では3mm角の基板1枚あたり38pmol、実施例2では3mm角の基板1枚あたり35pmolであり、いずれもオリゴヌクレオチドが高密度に固定していることが明らかになった。

【0025】

【発明の効果】本発明の化学修飾を施した基体は、化学修飾がされ活性化エステル基を有しているため、DNA等核酸を安定して固定化できるので、PCRを行うにあたり有利である。また、本発明の製造方法により、DNA等を安定して固定化できる基体を効率よく生産できる。特にカルボジイミドおよびN-ヒドロキシスクシンイミドを用いて、N-ヒドロキシスクシンイミド活性化して得られるジエステルを用いることにより、酸クロリドの存在化クロロホルム中で還流操作をすることなく、固体支持体表面に活性化エステル基を化学修飾することができる。また、この状態で商品として、ユーザーは容易にDNAを固定化することができる。

フロントページの続き

(72)発明者 丹花 通文

山口県下松市東豊井1296番地の1 東洋鋼
板株式会社技術研究所内

(72)発明者 岡村 浩

山口県下松市東豊井1296番地の1 東洋鋼
板株式会社技術研究所内

(72)発明者 高木 研一

山口県下松市東豊井1296番地の1 東洋鋼
板株式会社技術研究所内

(72)発明者 高橋 浩二郎

広島県広島市南区宇品御幸1丁目9番26号

(72)発明者 高井 修

広島県広島市南区宇品東2丁目2番29号
株式会社日本パーカーライジング広島工場
テクノセンター内

(72)発明者 高木 誠

福岡県福岡市博多区昭南町3丁目4番29号

(72)発明者 竹中 繁織

福岡県古賀市舞の里4-23-21

F ターム(参考) 4G046 CC10

4G059 AA08 AC30

4G072 AA01 JJ47 UU30

4H006 AA02 AA05 AB80 AB81 AC48

AC53 BJ50 BS10 BU26 BV22